

Многомерный анализ рамановских спектров биологических тканей с помощью регрессионного анализа

А.А. Лыкина¹, Д.Н. Артемьев¹, В.И. Кукушкин², И.А. Братченко¹, С.Т. Авраимова³, Н.С. Александров³

¹Самарский национальный исследовательский университет им. академика С.П. Королева, Московское шоссе 34А, Самара, Россия, 443086

²Институт систем обработки изображений РАН - филиал ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН, Молодогвардейская 151, Самара, Россия, 443001

³Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России, Трубетская 8-2, Москва, Россия, 119991

Аннотация. Данная работа посвящена исследованию спектральных свойств интактных и опухолевых тканей почки. Для возбуждения рамановского рассеяния света и автофлуоресценции использовали лазеры с длинами волн 532 нм, 785 нм и 1064 нм. В качестве исследуемых образцов использовали визуально и морфологически неизменные ткани почек человека, а также опухолевую ткань. В рамановских спектрах были выявлены специфические спектральные «маркеры» для каждого исследованного объекта. Основным методом анализа полученных спектральных характеристик являлся метод проекции на латентные структуры для выделения спектральных признаков между типами тканей.

1. Введение

На сегодняшний день рак почки является одной из ведущих проблем современной онкологии, связанной не только с высокими темпами прироста заболеваемости, но и с трудностью его диагностики [1]. Для исследования патологических процессов в биологических тканях используют гистологическое исследование, которое основывается на изучении строения, жизнедеятельности и развития тканей живых организмов на клеточном уровне. В современных исследованиях биологических тканей применяются спектральные методы, основанные на измерении оптических свойств веществ и свободные от использования дополнительных химических реагентов [2]. Одни из распространённых оптических методов являются анализ автофлуоресценции (АФ) [3] и Рамановская спектроскопия (РС) [4,5]. Регистрируемые спектры биологических тканей включают в себя спектральные характеристики, которые отличаются между собой компонентным составом биомолекул в составе ткани. Анализ экспериментальных данных и оценка возможности разделения типов биологических тканей по их спектральным особенностям были выполнены с использованием регрессионного анализа.

2. Материалы и методы

2.1 Экспериментальная установка

Для сбора рассеянного излучения использовали три экспериментальные установки: портативные спектрометры фирмы EpSpectr с длинами волн 532 нм и 1064 нм и измерительная

система, в состав которой входит лазер LML-785.0RB-04, волоконный рамановский зонд (Inphotonics RPB785) и спектрограф Sharmrock SR-500i с интегрированной камерой ANDOR DV-420A-OE. Параметры экспериментальных установок представлены в таблице 1.

Таблица 1. Параметры экспериментальной установки.

Регистрируемый сигнал	Наименование лазера	Длина волны возбуждения (нм)	Мощность лазера (мВт)	Оптическое разрешение спектрографа (см ⁻¹)
АФ	EnSpectr R532	532	30	2
РС	LML-785.0RB-04	785	200	1
РС	EnSpectr R1064	1064	300	10

Время экспозиции составляло 60 секунд. Запись трех спектров для каждого исследуемого образца выполнялась последовательно.

2.2 Образцы исследования

Был проведен стандартизированный отбор тканей человека (11 образцов), из них 1 образец соответствовал интактной ткани почки (Intact tissue), 9 образцов - светлоклеточный вариант почечноклеточного рака (ССА), и 1 образец хромофобного варианта почечноклеточного рака (ChRCC). Исследуемые образцы были получены на базе ЦПАО Первого Московского государственного медицинского университета имени И. М. Сеченова. Соответствие образцов тканей к категории сохранных или опухолевых проводили с помощью гистологического и иммуногистохимического методов исследования.

2.3 Методы обработки данных

Анализ экспериментальных данных и оценка возможности апостериорного разделения типов биологических тканей по их спектральным особенностям были выполнены с использованием регрессионного анализа [6]. Регистрируемый сигнал включает в себя компоненты автофлуоресценции (АФ) и рамановского рассеяния, поэтому для выделения рамановского сигнала была выполнена предварительная обработка сырого спектра. Для уменьшения влияния шумов использовался сглаживающий фильтр Savitzky–Golay, выделение рамановского сигнала осуществлялось коррекцией базовой линии с помощью метода асимметричных наименьших квадратов (Baseline Correction with Asymmetric Least Squares) и нормирование данных применялось с использованием стандартного отклонения случайной величины с нормальным распределением (Standard Normal Variate). Методы предобработки были реализованы в облачном сервисе TPTcloud (<https://tptcloud.com/>).

В рамановских спектрах биологических тканей присутствуют скрытые связи между различными полосами спектра, обусловленные вкладом в эти полосы одними и теми же химическими компонентами. Следовательно, для анализа спектральных данных химических компонентов биологических тканей был применен метод проекции на латентные структуры - PLS [7], который предоставляет возможность интерпретировать результаты в доступной форме, основываясь на меньшем количестве билинейных компонентов. Определение информативных полос рамановского спектра реализовано с помощью анализа распределения независимой переменной в проекции данных VIP.

3. Результаты исследования

3.1 Неупругое рассеяние ткани почки человека излучения видимого и ближнего ИК диапазона

В исследовании биологических тканей проводилась регистрация неупругого рассеяния опухолевых тканей почек, морфологически соответствующих светлоклеточному и хромофобному вариантам почечноклеточного рака. Их сравнивали с регистрируемым сигналом

интактной ткани почки человека. Представим нормированные усредненные регистрируемые сигналы тканей почки человека излучения видимого и ближнего ИК диапазона на рисунке 1.

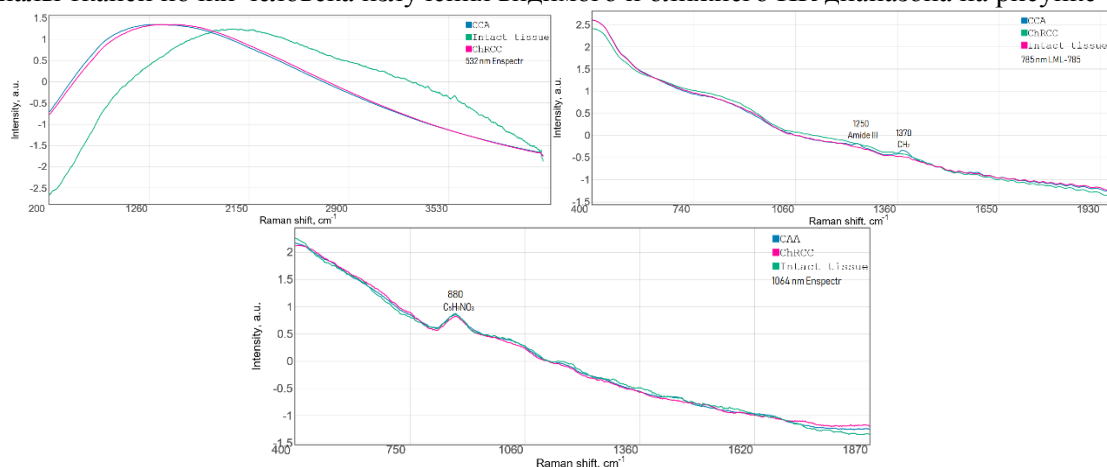


Рисунок 1. Неупругое рассеяние ткани почки человека излучения видимого и ближнего ИК диапазона.

Исследуя регистрируемое неупругое рассеяние тканей почки человека излучения на длине волны 1064 нм, можно сделать вывод, что регистрируемые сигналы интактной ткани и опухолевых тканей почки человека совпадают по форме и имеют общий рамановский пик на волновом числе 880 см^{-1} , который соответствует гидроксипролину ($\text{C}_5\text{H}_9\text{NO}_3$, коллаген) [2]. Заметим, что для лазера на длине волны 785 нм регистрируемые сигналы интактной ткани и хромофобного рака почки человека совпадают по форме и не имеют рамановских пиков, в отличие от регистрируемых сигналов светлоклеточного рака (1250 см^{-1} (Амид III (липиды и белки)) и 1370 см^{-1} (верные колебания CH_2 (коллаген и нуклеотидные кислоты)) [4,5]. Рассматривая регистрируемое неупругое рассеяние опухолей и интактных тканей почки человека излучения на длине волны 532 нм было выявлено увеличение интенсивности автофлуоресценции и отсутствие информативных рамановских пиков. Тем не менее сигналы ткани светлоклеточного и хромофобного рака почки человека имеют совпадение по форме и интенсивности АФ, в отличие от регистрируемого сигнала интактной ткани, который имеет высокое соотношения сигнал/шум относительно сигналов других опухолевых тканей.

3.2 Регрессионная модель анализа рамановских спектров биологических тканей почки

Следующим этапом исследования было проведено построение регрессионной модели по рамановским спектрам опухолевых и интактных тканей почки человека. Для выделения рамановского сигнала у регистрируемого сигнала тканей почки проводили удаление от АФ, используя метод выделения рамановского сигнала, сглаживания сигнала и нормирования. Для определения информативных полос рамановских спектров тканей почки человека были построены VIP-показатели для разделения светлоклеточного рака из всех образцов. Исходя из отсутствия рамановских пиков у регистрируемых сигналов опухолевых и интактных тканей почки человека излучения на длине волны 532, для исследования VIP-переменных использовались только рамановские спектры тканей излучения в ближнем ИК диапазоне (рис. 2).

Для светлоклеточного рака, используя излучения на длинах волны 785 нм и 1064 нм, наиболее информативными полосами являются $330\text{--}500\text{ см}^{-1}$ (АФ), 750 см^{-1} (триптофан (липиды и белки)), 880 см^{-1} (гидроксипролину ($\text{C}_5\text{H}_9\text{NO}_3$, коллаген)), 950 см^{-1} (колебания CH группы в связи фенилаланина (белки)), 1002 см^{-1} (фенилаланин (белки)), 1250 см^{-1} (Амид III (липиды и белки)), 1300 см^{-1} (CH_3 , CH_2 колебания (коллаген)), 1350 см^{-1} (CH_3 , CH_2 колебания (коллаген)), 1450 см^{-1} (деформационные колебания группы CH_2 (липиды и белки)) и 1600 см^{-1} (триптофан (липиды и белки)), 1650 см^{-1} (Амиде I (белки)) [8,9].

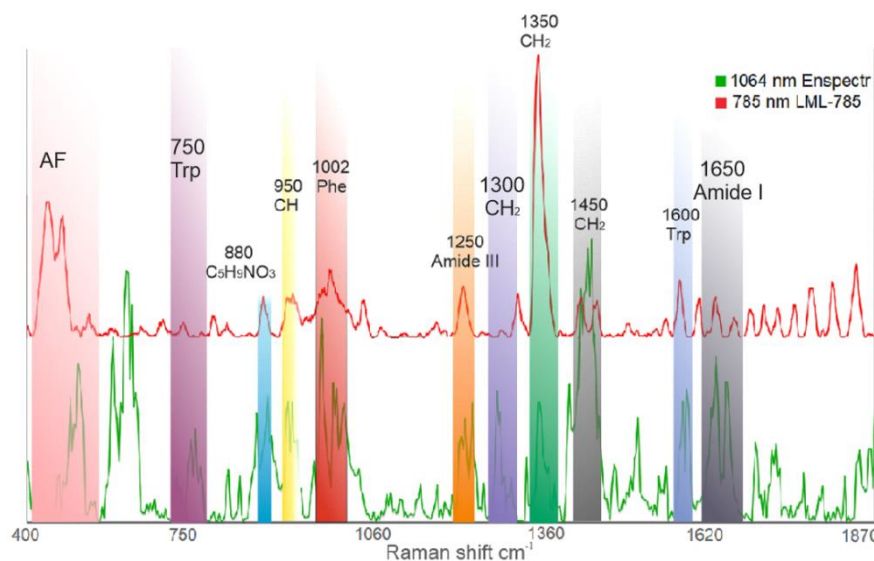


Рисунок 2. VIP-переменные PLS модели для дискриминации светлоклеточного рака человеческой почки от других типов тканей для лазеров с длинами волн 785 нм и 1064 нм (AF- автофлуоресценция, Phe- фенилаланин, Trp-триптофан).

Отметим, что VIP-переменные позволили выделить наиболее информативные рамановские пики светлоклеточного рака (лазера на длине волны 1064 нм) на волновых числах 1002 см⁻¹, 1450 см⁻¹, 1650 см⁻¹. При этом для лазера длиной волны 785 нм VIP-переменные PLS модели выделили наиболее информативные полосы 1335 см⁻¹, 1002 см⁻¹ и 330-500 см⁻¹ (АФ). В работе спектральные различия биологических тканей почки человека могут быть вызваны наличием высоких концентраций митохондрий в цитоплазме клеток онкоцитомы почки [10]. В исследовании был продемонстрирован метод SERS с наночастицами серебра (AgNPs), используемых в качестве субстратов для дифференциации рака и здоровых клеток почек. Наиболее информативными пиками раковых клеток были выделены 667 см⁻¹ (липопротеин, гликоген), 800 см⁻¹ (цитозин, протеин, гликоген) и 993 см⁻¹ (фенилаланин), 1330 см⁻¹ (белки), 1576 см⁻¹ (белки). Рост интенсивности рамановского пика раковых клеток (993 см⁻¹) относительно здоровых клеток, объясняется увеличением концентраций фосфолипидов в раковых клетках из-за возможного увеличения производства жирных кислот. В раковых клетках ускоряется деление клеток, поэтому им необходимо продуцировать новые фосфолипиды для поддержания целостности клеточной мембраны.

4. Заключение

Неупругое рассеяние опухолевых и интактной ткани почки человека излучения на длине волны 532 нм отличались между собой формой и интенсивностью. Результаты исследования показали, что наиболее информативные рамановские полосы светлоклеточного рака для лазера на длине волны 785 нм были выявлены на волновых числах 330-500 см⁻¹ (АФ), 980-1130 см⁻¹ и 1360-1420 см⁻¹. Соответственно, для излучения длиной волны 1064 нм информативными пиками являлись 1002 см⁻¹, 1450 см⁻¹, 1650 см⁻¹. Спектральные различия аденокарциномы почек обусловлены наличием высоких концентраций митохондрий в цитоплазме раковых клеток.

5. Литература

- [1] Humphrey, P.A. The Washington Manual of Surgical Pathology / P.A. Humphrey, L.P. Dehner, J.D. Pfeifer. – Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2008. – 980 p.
- [2] Huang, N. Full range characterization of the Raman spectra of organs in a murine model / N. Huang, M. Short, J. Zhao, H. Wang, H. Lui, M. Korbelik, H. Zeng // Optics Express. – 2011. – Vol. 19. – P. 22892-22909.

- [3] Liu, Y. Renal mass biopsy using Raman spectroscopy identifies malignant and benign renal tumors: potential for pre-operative diagnosis / Y. Liu, Z. Du, J. Zhang, H. Jiang // *Oncotarget*. – 2017. – Vol. 8. – P. 36012-36019.
- [4] Lorinz, A. Raman spectroscopy for neoplastic tissue differentiation: a pilot study / A. Lorinz, D. Haddad, V. Naik, R. Naik, A. Fung, A. Cao, P. Manda, A. Pandya, G. Auner, R. Rabah, S.E. Langenburg, M.D. Klein // *J. Pediatr. Surg.* – 2004. – Vol. 39. – P. 953-956.
- [5] Stewart, S. Distinguishing between renal oncocytoma and chromophobe renal cell carcinoma using Raman molecular imaging / S. Stewart, H. Kirshner, P.J. Treado, R. Priore, M. Tretiakova // *J. of Raman Spectroscopy*. – 2014. – Vol. 45. – P. 274-280.
- [6] Esbensen, K. *Multivariate Data Analysis* / K. Esbensen. – New Jersey: In Practice 4-th Ed., 2000. – 587 p.
- [7] Wold, S. PLS-regression: a basic tool of chemometrics / S. Wold, M. Sjostrom, L. Eriksson // *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*. – 2001. – Vol. 58. – P. 190-130.
- [8] Huang, Z. Effect of formalin fixation on the near-infrared Raman spectroscopy of normal and cancerous human bronchial tissues / Z. Huang, A. Mcwilliams, S. Lam, J. English, D.I. Mclean, H. Lui, H. Zeng // *International J. of Oncology*. – 2003. – Vol. 23. – P. 649-655.
- [9] Mert, S. Surface-Enhanced Raman Scattering-Based Detection of Cancerous Renal Cells / S. Mert, M. Culha // *Applied Spectroscopy*. – 2014. – Vol.68. – P. 617-624.
- [10] Kalasinsky, K.S. Raman Chemical Imaging Spectroscopy Reagentless Detection and Identification of Pathogens: Signature Development and Evaluation / K.S. Kalasinsky, T. Hadfield, A.A. Shea, V.F. Kalasinsky, M.P. Nelson, J. Neiss, A.J. Drauch, G.S. Vanni, P.J. Treado // *Anal. Chem.* – 2007. – Vol. 79. – P. 2658-2673.

Благодарность

Это исследование было проведено благодаря Министерству образования и науки Российской Федерации.

Multivariate analysis of the Raman spectra of biological tissues using regression methods

A.A. Lykina¹, D.N. Artemyev¹, V.I. Kukushkin², I.A. Bratchenko¹, S.T. Avraamova³, N.S. Aleksandrov³

¹Samara National Research University, Moskovskoe Shosse 34A, Samara, Russia, 443086

²Image Processing Systems Institute of RAS - Branch of the FSRC "Crystallography and Photonics" RAS, Molodogvardejskaya street 151, Samara, Russia, 443001

³Sechenov University, 8-2 Trubetskaya st., Moscow, Russia, 119991

Abstract. This work is devoted to the spectral properties study of intact and tumor kidney tissues. Lasers with a wavelengths of 532 nm, 785 nm, and 1064 nm were used to excite Raman scattering and autofluorescence. Visually and morphologically unchanged tissues of human kidneys as well as tumor tissue were examined. Raman spectra have specific spectral "markers" for each tested object. The analysis of the spectral characteristics was carried with using projection on latent structures method to highlight the spectral features between the tissue types of.